



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **121653** (13) **C2**  
(51) МПК

**A01H 1/02** (2006.01)

**A01H 1/04** (2006.01)

**A01H 5/10** (2018.01)

**A01D 43/14** (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ  
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА  
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

<b>(21)</b> Номер заявки:	<b>а 2016 09393</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и):	<b>Джоліф Томас (GB), Глю Марк (GB), Раслінг Марк (GB), Муріньо Ален (FR), Варен Пьєрік (FR)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки:	<b>10.03.2015</b>	<b>(73)</b> Власник(и):	<b>ЛІМАГРЕН ЕРОП, Rue Henri Mondor, Biopôle Clermont- Limagne, F-63360 Saint-Beauzire, France (FR)</b>
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на винахід:	<b>10.07.2020</b>	<b>(74)</b> Представник:	<b>Слободянюк Оксана Олександрівна, реєстр. №216</b>
<b>(31)</b> Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>14305344.5</b>	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	<b>AU 2006/203431 A1, 22.02.2007 WO 2012/038350 A1, 29.03.2012 Perez-Prat E et al, "Hybrid seed production and the challenge of propagating male-sterile plants", Trends in Plant Science, Elsevier Science, Oxford, GB, 01.05.2002, vol. 7, no. 5, P. 199 - 203</b>
<b>(32)</b> Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>10.03.2014</b>		
<b>(33)</b> Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	<b>EP</b>		
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заявку:	<b>27.02.2017, Бюл.№ 4</b>		
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту:	<b>10.07.2020, Бюл.№ 13</b>		
<b>(86)</b> Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	<b>РСТ/EP2015/054963, 10.03.2015</b>		

## (54) СПОСІБ ОБМЕЖЕННЯ ЧАСТКИ НАСІННЯ ЧОЛОВІЧИХ РОСЛИН ЗЕРНОВИХ КУЛЬТУР В НАСІННЕВОМУ ФОНДІ

### (57) Реферат:

Винахід стосується способу обмеження частки насіння чоловічих рослин зернових культур, що самозапліднюються, в насінневому фонді, який отримується з поля, що містить насадження більш низькорослих жіночих запилених рослин з чоловічою стерильністю і насадження більш високорослих рослин з чоловічою фертильністю, де більш низькорослі жіночі запилені рослини з чоловічою стерильністю є карликовими, напівкарликовими або подвійними карликовими рослинами, де спосіб включає пропускання інструмента, який проходить вище від висоти більш низькорослих жіночих рослин, між періодом цвітіння та збиранням урожаю, при цьому за допомогою інструмента наносять гербіцид на рослини з чоловічою фертильністю, які перевищують висоту більш низькорослих жіночих рослин, при цьому відбувається запобігання або послаблення нормального розвитку рослин з чоловічою фертильністю, що перевищують цю висоту і розділення насіння за розміром або щільністю для видалення небажаного зморщеного насіння чоловічих рослин, що самозапилюються, після збору врожаю.

UA 121653 C2



Даний винахід відноситься до способу одержання гібридного насіння, зокрема гібридного насіння зернових культур, та до нового застосування інструментів та/або хімічних речовин, зокрема гербіцидів, у даному контексті.

Передумови створення винаходу

5 Одержання гібридного насіння зернових культур є основною проблемою для компаній із виготовлення насіння, зокрема, для всіх типів пшениці, ячменю та рису, проте для будь-яких інших сільськогосподарських культур, що розмножуються насінням, зокрема сільськогосподарських культур, наприклад, тритикале, видів вівса, проса або жита, з даного винаходу також може бути одержана користь.

10 Гібридну пшеницю можна одержати за допомогою хімічного засобу для гібридизації (СНА). Чоловічі та жіночі рослини висівають смугами, при цьому часто, але не завжди чоловічі рослини є вищими, ніж жіночі рослини, для забезпечення кращого розповсюдження пилку. СНА застосовують для попередження утворення пилку на жіночих рослинах. Єдиним комерційно застосовуваним СНА є CROISOR® 100 від SAATEN-UNION.

15 Ту саму виробничу систему висівання смугами або рядами можна застосовувати щодо рослин з чоловічою стерильністю (жіночих), одержаних в результаті застосування генетичних ознак ядерної чоловічої стерильності або цитоплазматичної чоловічої стерильності спільно із застосуванням відновника(відновників) для одержання фертильного гібридного насіння. Такі ознаки можуть впливати з природних технологій або технологій GMO та з одного або декількох генів.

20 Обидва з цих типів систем передбачають застосування висівання чоловічих та жіночих рослин смугами або рядами. Можна застосовувати різні частки, та навіть у випадку, якщо площа смуг або рядів чоловічих рослин менша, ніж для смуг або рядів жіночих рослин, частка жіночих рослин зазвичай не буде перевищувати дві третини від усіх рослин. Крім того, розповсюдження пилку можна не оптимізувати, а врожай необхідно збирати таким чином, щоб уникнути збирання донора пилку разом з гібридним насінням.

25 У ячменю система одержання гібридів була описана Syngenta, при цьому висівали просту суміш із 95 % насіння жіночих рослин та 5 % насіння чоловічих рослин. Урожай містить достатньо гібридного насіння для того, щоб відповідати вимогам до комерціалізації гібридів. Крім того, висівання вищої відсоткової частки чоловічих рослин має підвищувати вихід гібридного насіння, проте при цьому також буде підвищуватися частка насіння чоловічих рослин у зібраному насінні. Крім того, вирощування гібридного насіння за допомогою даної системи змішаного насадження, де 95 % насіння є насінням жіночих рослин, на противагу системі вирощування у смугах, де, наприклад, лише дві третини є насінням жіночих рослин, має підвищувати ефективність виробництва гібридного насіння на одиницю площі.

30 Якщо жіночі та чоловічі рослини висівають за типом змішаного насадження, то врожай містить насіння, що утворюється на стерильних жіночих рослинах, які запилюються чоловічими рослинами, та насіння чоловічих рослин, яке самозапилюється. Видалення насіння з чоловічої батьківської особини під час одержання гібридів можна досягти декількома шляхами. Можна застосовувати фенотипічний маркер для видалення всіх або частини насіння чоловічих рослин, яке самозапилюється. Застосування маркера забарвлення під час одержання гібридного насіння із застосуванням цитоплазматичної чоловічої стерильності описано в US 3842538. Застосування маркера синього забарвлення насіння описано у Zong-Jun Pu et al. (2005). Дослідження схрещування ліній з домінантною карликовістю та ядерною чоловічою стерильністю з маркером синього забарвлення насіння у м'якої пшениці описані у Wheat Information Services Number 99: 46-50. У WO 2012/038350 описано застосування світла ближньої інфрачервоної зони спектра для проведення відбору між насінням гібридів та гомозиготних рослин на підставі фенотипічних відмінностей. Застосування системи, такої як такі маркери насіння, передбачає інтрогресію гена(генів) відповідного фенотипічного маркера в застосовуваний генетичний матеріал.

40 Карликові рослини пшениці з чоловічою стерильністю, а також їхнє застосування в рекурентній селекції пшениці описані в роботі Yang et al., (2009): A revolutionary Breeding Approach to wheat, Q.Y. Shu (ed), Induced Mutation in the Genomics Era. Food and agriculture organization of the United Nations, Rome, p. 370-372. Цей спосіб має назву "технічна система застосування карликових рослин пшениці з чоловічою стерильністю". Згідно з даним способом суміш карликових рослин з чоловічою стерильністю та високорослих чоловічих рослин висівають для покращення запилення. Подібні підходи наведені в іншій роботі, Cao W. et al., 2008, A molecular marker closely linked to the male sterile Ms2 gene in common wheat (*Triticum aestivum*), 11<sup>th</sup> international wheat genetic symposium proceeding, p1-3, в якій йдеться, що якщо ген чоловічої стерильності Ms2 Taigu був клонований та зчеплений з геном стійкості до

гербіцидів, то його можна було застосовувати для одержання комерційних сортів гібридної пшениці у випадку, коли відновник фертильності ставав доступним.

Цілі винаходу

Досі існує потреба в способі ефективного одержання гібридного насіння, зокрема, зернових культур, зокрема пшениці та ячменю.

Отже, метою даного винаходу є надання нового способу, що забезпечує ефективне та економічно вигідне одержання гібридного насіння.

Іншою метою є надання такого способу, який дозволяє одержувати гібридне насіння, яке відповідає нормативним вимогам, зокрема Європейської системи сертифікації, до рівня гібридності, який на сьогодні визначений на рівні 90 % для пшениці, ячменю, рапсу, тритикале та рису.

Іншою метою є надання такого способу, який дозволяє ефективно одержувати гібридне насіння з належною або підвищеною врожайністю на одиницю площі застосовуваної землі.

Іншою метою є надання такого способу, який дозволяє одержувати гібридне насіння із застосуванням підвищеної частки насіння чоловічих рослин, зокрема частки, що перевищує 5 % відносно насіння з чоловічою стерильністю від усього насіння батьківських рослин.

Ще одною метою є надання такого способу, який дозволяє одержувати у врожаї менше насіння чоловічих рослин, ніж було посіяно, тобто знижувати частку насіння чоловічих рослин у врожаї порівняно з тим, що було висіяно.

Короткий опис винаходу

Спосіб згідно з даним винаходом оснований на застосуванні рослин із чоловічою фертильністю (які утворюють пилок для запилення жіночих рослин (з чоловічою стерильністю)), які є більш високорослими, ніж жіночі рослини (з чоловічою стерильністю), що забезпечує можливість широкомасштабного знищення більш високорослих фертильних чоловічих рослин після запилення жіночих рослин за допомогою легкого в здійсненні способу, оснований на застосуванні механічних та/або хімічних засобів. Крім того, спосіб впливає на основний пагін та більш високорослі вторинні пагони чоловічих рослин, які є більш високорослими, ніж жіночі рослини, проте більш низькорослі або вторинні пагони також можуть зазнавати дії хімічної обробки чоловічих рослин, навіть якщо ці пагони не знаходились у безпосередньому контакті з хімічною речовиною.

Спосіб оснований на застосуванні відмінності у висоті між фертильними чоловічими та жіночими рослинами шляхом відбору чоловічих рослин, які є більш високорослими, ніж відповідні жіночі рослини, зокрема, наприклад, під час застосування пшениці з однією мутацією або декількома мутаціями гена *rht*, при цьому жіноча рослина є більш низькорослою, ніж чоловіча рослина. Чоловічі та жіночі рослини можна висівати у вигляді суміші або сіяти близько розташованими рядами або борознами, і після цвітіння чоловічі рослини можна вибірково знищувати, наприклад, шляхом застосування машини для збирання бур'янів або еквівалентного фізичного/механічного пристрою, пов'язаного або не пов'язаного із застосуванням гербіциду. Додатковий відбір насіння можна виконувати для усунення небажаного насіння чоловічих рослин з одержуваного насіннєвого фонду. Під "насіннєвим фондом" у контексті даного винаходу передбачають число зібраного насіння.

Отже, даний винахід відноситься до способу одержання гібридного насіння, зокрема гібридного насіння зернових культур, який включає схрещування насадження більш низькорослих жіночих рослин (з чоловічою стерильністю) (більш низькорослих, ніж фертильні рослини) з насадженням більш високорослих фертильних рослин (більш високорослих, ніж жіночі рослини). Спосіб включає обмеження частки насіння чоловічих рослин, що самозапліднюються, у кінцевому одержуваному насіннєвому фонді. Обмеження частки насіння чоловічих рослин, які самозапліднюються, включає щонайменше однократне пропускання інструмента, що проходить вище від висоти більш низькорослих жіночих рослин, але нижче від рівня висоти більш високорослих рослин із чоловічою фертильністю, між періодом цвітіння, переважно закінченням періоду цвітіння, та збиранням урожаю. Інструмент призначений для запобігання нормальному розвитку цих рослин із чоловічою фертильністю, які перевищують цю висоту, або його послаблення. Інструмент приходить у контакт із такими рослинами із чоловічою фертильністю, які перевищують цю висоту, та зумовлює запобігання їхньому нормальному розвитку або його послаблення.

Даний винахід також відноситься до способу одержання гібридного насіння зернових культур з поля, що містить насадження більш низькорослих жіночих запилених рослин (із чоловічою стерильністю) та насадження більш високорослих рослин із чоловічою фертильністю, при цьому спосіб включає пропускання інструмента, що проходить вище від висоти більш низькорослих жіночих рослин, між періодом цвітіння, переважно закінченням періоду цвітіння,

та збиранням урожаю, при цьому за допомогою інструмента щодо більш високорослих рослин із чоловічою фертильністю застосовують механічну дію та/або хімічну речовину, за допомогою чого запобігають розвитку рослин із чоловічою фертильністю, які перевищують цю висоту, або послаблюють його.

5 За допомогою способу цю частку насіння чоловічих рослин, що самозапліднюються, в кінцевому одержуваному насіннєвому фонді обмежують пороговою величиною, переважно величиною, яка відповідає нормативному рівню гібридності.

Зокрема, за допомогою способу обмежують розвиток насіння на чоловічих рослинах після запилення жіночих рослин для зниження або усунення частки насіння чоловічих рослин, що самозапліднюються, в кінцевому одержуваному насіннєвому фонді. Насіння чоловічих рослин, що самозапліднюються, які можуть бути одержані, можна додатково усувати або піддавати зниженню кількості під час збирання врожаю. Крім того, частку чоловічих рослин можна усувати із соломом під час збирання врожаю, наприклад, під час застосування збиральної машини.

15 Даний винахід також відноситься до застосування інструмента, такого як машина для видалення бур'янів, за допомогою якого застосовують хімічну речовину, переважно гербіцид, та/або до застосування хімічної речовини, наприклад гербіциду, переважно гербіциду, який є системним, для запобігання нормальному розвитку більш високорослих фертильних рослин або його послаблення між періодом цвітіння, переважно закінченням періоду цвітіння, та збиранням урожаю на полі, яке містить більш низькорослі жіночі рослини (з чоловічою стерильністю) та 20 більш високорослі фертильні рослини, для одержання гібридного насіння, зокрема гібридного насіння зернових культур, де хімічну речовину, наприклад гербіцид, застосовують щонайменше однократно щодо більш високорослих фертильних рослин, які виступають за висотою над більш низькорослими жіночими рослинами, між періодом цвітіння та збиранням врожаю. Інструмент застосовують після запилення.

25 Даний винахід також відноситься до застосування інструмента, такого як машина для видалення бур'янів, за допомогою якого застосовують хімічну речовину, переважно гербіцид, та/або до застосування хімічної речовини, наприклад гербіциду, переважно гербіциду, який є системним, для запобігання утворенню насіння рослин, що самозапліднюються, або його послаблення фертильними рослинами між періодом цвітіння, переважно закінченням періоду 30 цвітіння, та збиранням урожаю на полі, яке містить більш низькорослі жіночі рослини (з чоловічою стерильністю) та більш високорослі фертильні рослини, для одержання гібридного насіння зернових культур, зокрема гібридного насіння зернових культур, де хімічну речовину, наприклад гербіцид, застосовують щонайменше однократно щодо більш високорослих фертильних рослин, які виступають за висотою над більш низькорослими жіночими рослинами, 35 між періодом цвітіння та збором урожаю. Інструмент застосовують після запилення.

Такі шляхи застосування призначені для обмеження частки насіння чоловічих рослин, що самозапліднюються, в кінцевому одержуваному насіннєвому фонді, зокрема пороговою величиною, переважно величиною, яка відповідає нормативному рівню гібридності.

40 Спосіб відноситься до одержання гібридної пшениці, але не обмежений одержанням гібрида із двох інбредних батьківських ліній, при цьому даний спосіб також слід застосовувати для одержання складних гібридів: трилінійних гібридів, подвійних гібридів тощо.

Детальний опис винаходу

45 Схрещування жіночих рослин (з чоловічою стерильністю) та рослин із чоловічою фертильністю включає початкове висівання насіння обох популяцій у безпосередній близькості для забезпечення високого рівня перехресного запилення. Однєю з переваг даного винаходу є забезпечення можливості змішаного висівання або висівання в близько розташованих рядах або іншого способу висівання, "близького до змішаного висівання", при цьому забезпечується обмеження кількості небажаного насіння в кінцевому врожаї, при цьому навіть підвищується відносне число фертильних рослин та доступність пилку під час схрещування.

50 Згідно з першим варіантом здійснення схрещування жіночих рослин (з чоловічою стерильністю) та рослин із чоловічою фертильністю включає висівання насіння у вигляді суміші. Згідно з цим варіантом здійснення суміш насіння жіночих рослин (з чоловічою стерильністю) та рослин із чоловічою фертильністю висівають у відповідному співвідношенні.

55 Згідно з другим варіантом здійснення схрещування жіночих рослин (з чоловічою стерильністю) та рослин із чоловічою фертильністю включає посів насіння жіночих рослин (з чоловічою стерильністю) та насіння рослин із чоловічою фертильністю в окремих рядах або борознах. Переважно насіння жіночих рослин (з чоловічою стерильністю) та насіння рослин із чоловічою фертильністю сіють паралельно. Як альтернатива насіння чоловічих та жіночих рослин висівають послідовно в тому самому або "загальному" ряді. Також можна висівати жіночі 60 та чоловічі рослини із застосуванням декількох рядів або борозен одного сорту, потім декількох

рядів або борозен іншого сорту тощо, при цьому декілька переважно зберігається на низькому рівні для забезпечення "близького розташування", зокрема, складається з 2 або більше борозен того самого сорту насіння.

Обмеження кількості чоловічих рослин у насіннєвому фонді включає пропускання інструмента, що проходить вище від висоти більш низькорослих жіночих рослин, але нижче від рівня висоти більш високорослих рослин із чоловічою фертильністю.

Згідно з переважним варіантом здійснення в інструменті застосовують хімічну речовину, переважно гербіцид, або має місце засіб для його застосування щодо більш високорослих чоловічих рослин, переважно під час вступу в контакт з рослинами, які виступають за висотою над більш низькорослими жіночими рослинами. Згідно з іншим варіантом здійснення інструмент зрізає більш високорослі чоловічі рослини вище від висоти більш низькорослих жіночих рослин. Як приклад застосовують "машину для збирання бур'янів", яка являє собою пристрій, який містить горизонтальну смугу або опору, що є рухомим, переважно приводиться в рух двигуном або закріплений на засобі пересування, що приводиться в рух двигуном. Висота, на якій розташована смуга, переважно є регульованою для того, щоб користувач регулював її висоту відносно висоти рослин, переважно міг її виміряти під час проходження по сільськогосподарській культурі. Смуга або опора переважно призначена для доставки хімічної речовини, переважно гербіциду, рослинам, які вступають в контакт зі смугою або опорою. Наприклад, смуга або пристрій містить валик, або щітку, або трос, або губку, або лезо та/або їм подібне та хімічну речовину, переважно гербіцид, який витікає із них струменем або просочує їх. Машини для збирання бур'янів, які застосовують у даному винаході або пристосовують до даного винаходу, описані в літературі, наприклад: CA 2313068, GB 2305590, US 4485588, WO 95/21524, WO 83/00601, EP 058612, US 4332107, US 4208835, AU 2006203431.

Альтернативою може бути застосування ріжучого інструмента, наприклад жнивної машини, з дуже високим рівнем підрізання для видалення виключно більш високорослих чоловічих рослин або, наприклад, разом із застосуванням пристрою для видалення волоті кукурудзи. Інструмент є рухомим, переважно приводиться в дію двигуном або закріплений на засобі пересування, що приводиться у рух двигуном. Висота, на якій розташований ріжучий інструмент, переважно є регульованою для того, щоб користувач регулював її висоту відносно висоти рослин, переважно міг її виміряти під час проходження по сільськогосподарській культурі.

Згідно з одним варіантом здійснення інструмент, такий як машина для збирання бур'янів або ріжучий інструмент, приводиться у рух двигуном та має засіб для автоматичного регулювання власної висоти відносно висоти рослин під час проходження по сільськогосподарській культурі. Такий засіб містить датчики для виявлення висоти жіночих та/або чоловічих рослин та для регулювання власної висоти залежно від даних, одержуваних за допомогою датчиків.

Насіння згідно з даним винаходом можна висівати у вигляді суміші з 5 % або більше, переважно приблизно 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 15 %, 10 % або 5 %, насіння чоловічих рослин. Також їх можна сіяти рядами або борознами за умови дотримання такої частки.

Таке співвідношення під час висівання або схрещування насіння або рослин із чоловічою фертильністю щодо насіння жіночих рослин або жіночих рослин (з чоловічою стерильністю) може варіювати від приблизно 5 % /приблизно 95 % до приблизно 50 % /приблизно 50 %. Під час застосування точних сільськогосподарських інструментів таке співвідношення та інші параметри, наприклад щільність висівання, можна безперервно регулювати на полі для одержання гібридів для забезпечення найкращого виходу гібридного насіння згідно з ґрунтовими та іншими даними про навколишнє середовище.

Даний винахід можна застосовувати, зокрема, до зернових культур, зокрема, до видів вівса, пшениці, ячменю, рису, спельти, тритикале, проса, жита або рапсу. Даний винахід охоплює гібридні автогамні зернові культури: овес (*Avena sativa*, який включає візантійський; *Avena nuda*; *Avena strigosa*), ячмінь (*Hordeum vulgare*), рис (*Oryza sativa*), пшеницю (*Triticum aestivum*), тверду пшеницю (*Triticum durum*), спельту (*Triticum spelta*) та тритикале (*Triticosecale*). Даний винахід також може охоплювати частково автогамні рослини, наприклад, рапс (*Brassica spp.*).

Інструмент можна застосовувати одразу після достатнього запилення жіночих рослин або одразу після завершення цвітіння жіночих рослин. Отже, інструмент можна застосовувати після настання або переважно в кінці періоду цвітіння або після періоду цвітіння рослин з чоловічою стерильністю. Його можна застосовувати в будь-який час між періодом цвітіння та збиранням насіння. Механічне усунення можна виконувати, наприклад, за допомогою ріжучого інструмента, та його ефект є негайним, усунення можна виконувати в будь-який час між періодом цвітіння та збиранням урожаю, проте переважно слід виконувати його якомога раніше після періоду цвітіння для оптимізації розвитку жіночих рослин (з чоловічою стерильністю) в

сільськогосподарській культурі. Хімічна, наприклад гербіцидна, обробка потребує деякого часу для впливу на рослини, тому час застосування визначають так, щоб він був ефективним до збирання врожаю, залежно від швидкості дії хімічної речовини, наприклад гербіциду, кількості застосовуваної хімічної речовини, наприклад гербіциду, погодних умов тощо, та знов-таки переважно виконувати її слід якомога раніше після періоду цвітіння для оптимізації розвитку рослин з чоловічою стерильністю в сільськогосподарській культурі. Загалом, усунення (механічне та/або хімічне) будуть переважно застосовувати між періодом цвітіння та 30, 20 або 10 днями після періоду цвітіння включно.

Застосовуванням гербіцидом є будь-який гербіцид або будь-яка інша хімічна речовина, здатна порушувати або зупиняти ріст рослин та розвиток насіння зернових культур під час застосування, виконаного або ефективного після настання періоду цвітіння або після періоду цвітіння та за вищевказаних умов. Гербіцидом переважно є системний гербіцид, що поступає в рослину під час контактної дії на рослину. Даний гербіцид переважно здатний знищувати рослини на цій стадії розвитку. Як приклад гербіцидом є гліфосат або глүфосинат, переважно їм є гліфосат. Гербіцид можна застосовувати однократно або за декілька застосувань (щонайменше два, наприклад 2 або 3). До гербіциду можна додавати допоміжний засіб для підвищення його ефективності, наприклад покращення контакту гербіциду з рослиною, та він може бути сприятливим. Отже, можна додавати компонент для підвищення проникності та дифузії гербіциду в рослину для надання більш ефективної системної дії.

Можна застосовувати інші компоненти, здатні знищувати більш високорослі рослини, наприклад десиканти. Під час застосування інструмента один раз або декілька раз можна виконувати додаткове видалення чоловічих рослин, які вижили, вручну.

Згідно з відмінною ознакою, обмеження частки насіння чоловічих рослин, що самозапліднюються, включає додатковий, після збирання насіння, відбір насіння для видалення насіння чоловічих рослин, що самозапліднюються, наприклад, відбір із застосуванням морфологічних критеріїв або ознаки, такої як розмір, або щільність, або форма, або склад, та/або деякий інший аспект насіння (зокрема, передчасно засохле або зморщене насіння), та/або із застосуванням фенотипічної ознаки, наприклад, забарвлення. Таке передчасно засохле або зморщене насіння може з'являтися у результаті дії гербіциду, зокрема, без обмеження із колосків, одержуваних з пагонів, підданих дії гербіциду, але повністю не знищених. Вторинні пагони чоловічих рослин також можуть давати насіння, якщо їхнє дозрівання достатньою мірою затримано відносно основного пагона, проте це насіння має бути незрілим під час збирання врожаю: дрібнішим та/або зеленішим. Таке усунення чоловічого насіння можна виконувати за допомогою будь-якого відомого способу. Найлегшим способом може бути сортування за розміром або щільністю, якщо існує значна різниця у розмірі, або іншим аспектом, та воно може дозволяти усунути дрібне насіння або зморщене насіння.

Отже, згідно з переважним варіантом здійснення після збирання врожаю виконують відбір насіння за його розміром або щільністю для відбору найбільш крупного насіння за його розміром або більш щільного насіння за його щільністю. Це забезпечує підвищення частки гібридного насіння серед зібраного насіння порівняно із сукупністю насіння в сільськогосподарській культурі.

Згідно з відмінною ознакою, обмеження кількості насіння чоловічих рослин, що самозапліднюються, також включає застосування фенотипічного маркера, асоційованого із сукупністю чоловічих рослин та/або з сукупністю жіночих рослин, і цей маркер, відповідно, застосовують окремо або разом з розміром або іншим аспектом для відокремлення насіння, одержуваного в результаті самозапліднення сукупності чоловічих рослин, від гібридного насіння, одержуваного в сукупності рослин з чоловічою стерильністю, або їх збереження.

Фенотипічний маркер переважно асоційований із сукупністю рослин з чоловічою стерильністю, та цей маркер застосовують для додаткового відокремлення насіння, одержуваного від сукупності чоловічих рослин, які запилюються та самозапліднюються, від гібридного насіння.

Згідно з певною відмінною ознакою винаходу схрещування виконують з чоловічою рослиною, яка є гібридною рослиною, вибраною за кращою здатністю до перехресного запліднення.

Для сертифікації гібридного насіння необхідно, щоб щонайменше деяка відсоткова частка зібраного насіння була одержана в результаті перехресного запліднення, а не в результаті самозапліднення. Отже, межа гібридності при комерціалізації гібридів для Європейської сертифікації на сьогодні становить 90 % для пшениці, ячменю, рапсу, тритикале та рису. Якщо припустити, що в класичній виробничій системі змішаного насадження самозапліднення чоловічих рослин відбувається вдвічі швидше, ніж перехресне запилення жіночих рослин, то

кількість насіння чоловічих рослин не має перевищувати деякий рівень в 5 % від усього висіяного насіння батьківських рослин для того, щоб у зібраному насінні зберігся поріг гібридності вищий від 90 %. Така частка висіяного насіння чоловічих рослин відносно насіння жіночих рослин може підвищуватися внаслідок усунення чоловічих рослин після періоду цвітіння та до збирання врожаю та можливого усунення насіння, одержуваного від сукупності чоловічих рослин, які запилюються та самозапліднюються. Даний спосіб є універсальним та дозволяє одержувати урожай з бажаною відсотковою часткою небажаного насіння чоловічих рослин, і ця величина може становити, наприклад, приблизно 15, 10, 5, 4, 3, 2 або 1 % відносно всього зібраного насіння після обробки зібраного насіння згідно з даним винаходом.

Спосіб за даним винаходом представляє основну перевагу оптимізації співвідношення висіяних чоловічих/жіночих рослин для такого одержання гібридів у конкретній комбінації чоловічих та жіночих інбредних ліній у конкретній сільськогосподарській культурі, у конкретному регіоні або в більш широкому розумінні з очікуваними наслідками щодо запліднення та одержання та виходу гібридного насіння. Спосіб дозволяє одержати кращу сукупність насіння внаслідок безпосередньої близькості чоловічих та жіночих рослин та належного розповсюдження пилку з огляду на більш сприятливе співвідношення між чоловічими та жіночими рослинами. Щільність пилку на будь-якій сільськогосподарській культурі необхідно підвищувати з урахуванням позитивного ефекту попередження випадкового запилення чужорідним пилком та наслідків щодо чистоти зібраного насінневого фонду. Іншою перевагою, яка має бути одержана, є легший протокол висівання, оскільки стає можливим висівання суміші насіння чоловічих та жіночих рослин, і це є легшим та економічно більш вигідним, ніж посів смугами. Іншою перевагою є те, що одержувані гібриди будуть давати більший вихід, оскільки вони містять більше гібридного насіння, яке має кращі характеристики, ніж насіння чоловічих рослин.

Лінії зернових культур, що застосовуються в способі за даним винаходом, можуть переважно бути карликовими, напівкарликовими або подвійними карликовими рослинами або інакше знаходитись під яким-небудь генетичним контролем пониженої або підвищеної довжини стебла.

Різниця у висоті між двома сукупностями рослин забезпечує оптимізацію розповсюдження пилку від більш високорослих рослин до сукупності більш низькорослих рослин, при цьому жіночі рослини можуть бути більш низькорослими; проте можна застосовувати стандартні жіночі та більш високорослі чоловічі рослини поряд з більш низькорослими чоловічими рослинами та навіть більш низькорослими жіночими рослинами або будь-яку іншу комбінацію, яка створює більшу різницю та бажаний вихід гібридів. Крім того, висівання у вигляді суміші попереджає надмірне збагачення більш високорослими чоловічими рослинами.

Взагалі, різниця у висоті має відповідати технічним вимогам самого застосування, та її можна оцінювати як таку, що потенційно становить від 1 метра до 10 або 20 сантиметрів або навіть менше. Що більш однорідною є висота рослин або сільськогосподарської культури, то меншою може бути необхідна різниця у висоті. Тому різниця у висоті від 5 до 20 см або навіть менше також має відповідати даному винаходу. З іншого боку, може бути несприятливим створення великої різниці у висоті та застосування занадто високорослих чоловічих рослин у зв'язку з ризиком вилягання. Отже, середня різниця у висоті може знаходитися в діапазоні від приблизно 5 см до приблизно 1 м, зокрема, від приблизно 10 см до приблизно 60 см, переважно від приблизно 20 см до приблизно 50 см.

Створення та застосування різниці в висоті між чоловічими та жіночими рослинами може бути досягнуто багатьма різними способами, які відомі від фахівця в даній галузі. Наприклад, у пшениці відомо багато генів карликовості та напівкарликовості:

- o Rht1, позначуваний в даному документі як Rht-B1b (4BS), та Rht2, позначуваний в даному документі як RHT-D1b (4DS), із японського сорту "Norin 10", Rht1 Pearce Stephen (2011), Molecular Characterization of Rht-1 Dwarfing Genes in Hexaploid Wheat. Plant Physiol, Vol 157, p 1820-1831;

- o Rht1s (Rht-B1d) із Saitama 27 Worland AJ and Petrovic S (1988), The gibberellic acid insensitive dwarfing gene from the variety Saitama 27. Euphytica 38:55-63 (алельний Rht1);

- o Rht3, позначуваний як Rht-B1c (4BS - алельний Rht-B1b), із Tom Thumb (див. Kleijer et al. (1984), Euphytica 33 107-112);

- o Rht8 (2DS) із сорту "Akakomugi", Gasperini et al. (2012), Genetic and physiological analysis of Rht8 in bread wheat an alternative source of semi-dwarfism with a reduced sensitivity to brassinosteroids. Journal of Experimental Botany. Vol 63 N°12 p4419-4436;

- o Rht9 (7BS) із сорту "Akakomugi", Ellis M.H. et al., (2005) Molecular mapping of gibberellin-responsive dwarfing genes in bread wheat., Theoretical and Applied Genetics, 111:423-430;



о Rht10, позначуваний як Rht-D1c (4DS), із сорту "Taigu" Izumi N et al., Genetic analysis of dwarfness in *Triticum aestivum* L. *Ai\_Bian* 1, 31, 38-48 (1983);

о та інші RHT4 (2BL), RHT5, RHT7 (2A), RHT12 (5AL), RHT13 (7BS), RHT14, Rht12.

Проте карликові рослини також можуть бути одержані в результаті простого відбору шляхом вибору низькорослих рослин у популяціях рослин-виробників або завдяки створенню пірамід QTL (локусів кількісних ознак) висоти або застосування стратегій на основі GMO (генетично модифікованих організмів).

У ячменю також відомо чимало мутацій, які впливають на висоту рослини, див. Franckowiak et al., (1987), Coordinator's report on the semi-dwarf barley collection, *Barley Genet News* 17:114-115. Найбільш часто застосовуваними генами карликовості є:

Ari-e GP; Uzu, Sdw1, Sdw3 (2HS) Gottwald et al., (2004) The gibberellic-acid insensitive dwarfing gene *sdw3* °F barley is located on chromosome 2HS in a region that shows high colinearity with rice chromosome 7L, *Mol Gen Genomics* N°4, 271: 426-436.

Карликові рослини ячменю також можуть бути одержані в результаті простого відбору шляхом вибору низькорослих рослин у популяціях рослин-виробників або завдяки створенню пірамід QTL (локусів кількісних ознак) висоти або застосування стратегій на основі GMO (генетично модифікованих організмів).

Лінії, застосовувані для даного протоколу, можуть бути низькорослими або високорослими або карликовими або подвійними карликовими рослинами, що були одержані будь-яким способом та знаходились під будь-яким видом генетичного контролю. Даний винахід можна починати зі створення стерильної низькорослої лінії.

Загалом, для способу необхідна жіноча рослина (з чоловічою стерильністю). Декілька способів одержання таких рослин були описані та відомі від фахівців у даній галузі.

Деякі схеми застосування цитоплазматичної чоловічої стерильності (CMS) у пшениці описані в Maan and Lucken (1972), Interacting male sterility restoration Systems for hybrid wheat Research, *Crop Science Vol 12*, Franckowiak et al..., (1976), A proposal for Hybrid Wheat Utilizing *Aegilops squarrosa* L. Cytoplasm, *Crop Science*, Vol. 16, p 725-728. Для огляду див. Whitford et al., (2013), Hybrid breeding in wheat: technologies to improve hybrid wheat seed production, *Journal of experimental Botany*, опубліковано в режимі онлайн 31 жовтня 2013 р.

Застосування CMS застосовували для одержання гібридів у ячменю: Ahokas H. (1998), Barley, Hybrid Cultivar development, у: BANGA, S.S. -BANGA, S. K. (eds), Narosa New Delhi, India., p 316-331. У даній системі застосовують дві цитоплазматичні системи CMS, відомі як *msm1* та *msm2*. Відоме відновлення фертильності для обох генів стерильності *Rfm1a* (6H). Див. відповідно Ahoras H. (1979) Cytoplasmic male sterility in barley. III maintenance of sterility and restoration of fertility in the *msm1* cytoplasm, *Euphytica* 28, 409-419; Ahoras H. (1982), Cytoplasmic male sterility in barley XI the *msm2* cytoplasm, *Genetics* 102:285-295; Matsui K. (2001) Molecular mapping of a fertility restoration locus (*Rfm1*) for cytoplasmic male sterility in barley (*Hordeum vulgare* L.), *Theor Appl Genet*, 102:477-482.

Одержання гібридних зернових культур може базуватися на генетичній чоловічій стерильності (GMS) та потребує схрещення чоловічої стерильної рослини, гомозиготної за рецесивним алелем *gms*, та чоловічої фертильної лінії, гомозиготної за домінантним алелем *GMS* (тобто дикого типу, нормальним, фертильним) того самого гена.

Для зернових культур існують інші способи одержання рослин з чоловічою стерильністю за допомогою систем *GMS*. Більшість із цих стратегій основана на застосуванні так званої лінії-закріплювача, яка під час самозапилення дає процентну частку жіночих рослин (з чоловічою стерильністю), що застосовуються для одержання гібридів, та процентну долю рослин-закріплювачів, які можна застосовувати для подальшого одержання стерильних рослин.

Застосування *GMS* у пшениці може передбачати:

о рецесивний *ms1* (4BS),

о *ms1a* із сорту Pugsley, Suneson et al., Use of Pugsley's Sterile wheat in Cross breeding, *Crop Science* 2(6): 534-535,

о *ms1b* із мутанта Probus (мутанта, одержаного в результаті впливу іонізуючого випромінювання), Driscoll CJ (1975) Cytogenetic analysis of two chromosomal male-sterility mutants in hexaploid wheat. *Australian Journal of Biological Sciences* 28:413-416,

о *ms1c* із Cornerstone (мутанта, одержаного в результаті впливу іонізуючого випромінювання), Barlow KK and Driscoll CJ (1981) Linkage studies involving two chromosomal male-sterility mutants in hexaploid wheat. *Genetics* 98:791-799,

о *ms1d* (FS2, EMS-мутант), EMS-мутанти *ms1e* (FS3), *ms1f* (FS24) із Klindworth et al..., Chromosomal location of genetic male sterility genes in four mutants of hexaploid wheat, *CROP SCIENCE*, 2002, 42(5): 1447-1450,

о ms1g із Lanzhou (Zhou KJ et al., (2008,) A new male sterile mutant LZ in wheat (*Triticum aestivum* L. *Euphytica* 159(3): 403-410).

Компенсація ефектів ms1 щодо чоловічої стерильності може передбачати:

- 5r із *Secale cereale* L. (з доміантним візуальним маркером (опушена квітконіжка, hp),

- 2RS, Fertility compensation of Cornerstone male sterility of wheat by rye. Hossain MA and Driscoll CJ *Genetics*. 1983 May; 104(1): 181-189,

- 4E, див. публікацію Zhou KJ (2006), The 4E-ms system of producing hybrid wheat. *Crop Science* 46, 250-255.

о Домінантний Ms2 (4DS) Ta1, Deng and Gao, The use of a dominant male sterile gene in wheat breeding. *Acta Agrom Sinica* 6: 85-98(1980); Liu B. et al., A dominant gene for male sterility in wheat. *Plant Breed* 97: 204-209 (1986), доміантний Ms3 (5AS) (EMS-мутант KS87UP9 з чоловічою стерильністю) Maan SS et al., Chromosome arm location and gene centromere distance of a dominant gene for male sterility in wheat. *Crop Sci.* 27 494-500 (1987);

о Домінантний Ms4 (4DS), третій доміантний ген чоловічої стерильності у м'якої пшениці, Maan SS, Kianian SF, *Wheat Information Service*, 93: 27-31;

о Рецесивний ms5 (3AL) (FS20, EMS-мутант) із Klindworth et al., Chromosomal location of genetic male sterility genes in four mutants of hexaploid wheat, *CROP SCIENCE*, 2002, 42(5): 1447-1450.

Існують інші системи чоловічої стерильності, проте стерильність основана на зовнішніх умовах: wptms1 (5B) та wptms2 (5B) із Guo et al., 2006 (*Theor Appl Genet* 112:1271-1276) та Wptms3 (1BS) із Chen et al..., (*Biomed & Biotechnol*) є термочутливими та чутливими до фотоперіоду.

У ячменю були ідентифіковані чимало генів генної або генетичної чоловічої стерильності msg, див. Ahokas H. (1998) *Barley, Hybrid Cultivar development*, у: BANGA, S.S. -BANGA, S.K. (eds), Narosa New Delhi, India., p 316-331.

Генетичні ДНК-маркери доступні для більшості, якщо не для всіх цих мутацій, проте фенотипічні (тобто видимі) маркери також можна застосовувати для відстежування, наприклад, алелів, які компенсують наявність гена gms. Існують деякі маркери, асоційовані зі синім або червоним забарвленням оплодня, та їх можна застосовувати для полегшення вимання, наприклад, стерильного або фертильного насіння.

а- Застосування хромосомних додаткових ліній для компенсації генної чоловічої стерильності

Цей спосіб одержання гібридів уперше був розроблений у ячменю - Ramage R.T. (1965, 1991), *Balanced tertiary trisomics for use in hybrid seed production*, *Crop. Sci.* 5: 177-178. Chromosome manipulation in barley breeding, Chap 18, *Chromosome Engineering in Plants: Genetics, Breeding, Evolution*, опубліковано за P.K. Gupta, T. Tsuchiya, p 385-400.

У пшениці перший приклад застосування додаткових ліній описаний в системі XYZ Discroll (1972, 1985, 1986), XYZ system of producing hybrid wheat, *Crop Sci.* 12: 516-517 (1972), Modified XYZ system of producing hybrid wheat; *Crop Science Vol. 25* p 1115-1116 (1985), Nuclear male sterility systems in seed production of hybrid varieties, *CRC Critical Reviews in Plant Sciences*, Vol. 3, Issue 3 p 227-256 та Driscoll (1986). Ця система базується на застосуванні гомологічної рецесивної мутації чоловічої стерильності та застосуванні лінії - "відновника", що містить додаткову хромосому, яка несе ген "відновника" в одній або двох копіях згідно з варіантом системи XYZ.

Компенсаційна хромосома може також містити фенотипічний маркер, наприклад, маркер опушеної шийки хромосоми 5R із *Secale cereale* L. Discroll (1972), Hossain and Discroll (1983), Fertility compensation of Cornestone male sterility of wheat by rye, *Genetics* 104:181-189. Інші джерела відновника фертильності тестували в Driscoll (1985). The alpha-arm isochromosome of *Triticum urartu*, Jakubz, Chromosome 4 or the long arm isochromosome of a modified barley chromosome 4HmL.

Генетичний маркер фенотипічного забарвлення може бути доданий до раніше описаної системи для відстежування компенсаційного гена в потомстві; маркер може забезпечувати відокремлення насіння в потомстві, як описано у WO 92/01366. Маркером фенотипічного забарвлення може бути синій алейрон із 4 хромосоми *Agropyron elongatum* (4g), див. Zeller et al., (1991). *Theor Appl Genet.* 81(4):551-8, та Zeven A.C., (1991). *Wheats with purple and blue grains: a review*, *Euphytica* 56: 243-258. Цей синій маркер транслокується на хромосому з 4 доміантними алелями від *Triticum thaoudar*, *Triticum monosocsum* або *Triticum urartu*. Таку транслоковану хромосому додатково застосовують як додаткову хромосому в системі XYZ.

У системі 4E/MS, описаній в Zhou KJ et al. (2006), The 4E-ms system of producing hybrid wheat. *Crop Science* 46, 250-255, застосовується додаткова лінія: 4E (*Agropyron elongatum*), яка

несе ген Ва синього забарвлення алейрона із *Agropyron* spp. (Bolton EF (1968) Inheritance of blue aleurone and purple pericarp in hexaploid wheat. PhD diss. Colorado Stat Univ. Fort Collins CO) з "ефектом дози гена", та домінуючий аналог дикого типу, MS1, який компенсує наявність алеля чоловічої стерильності ms1.

- 5 Аналогічна система була розроблена Huang S.S. et al. (1991). The development of a blue marked nucleus male sterile line and its maintainer in bread wheat, *Acta Agronomica Sinica*. 17:81-87.

Фенотипічний маркер, асоційований зі стерильністю, також може бути зчеплений з геном, який відповідає за розмір рослини, таким як мутант *rht*. Наприклад, маркер синього забарвлення насіння може бути доданий у хромосому, що містить домінуючий ген Ms2 чоловічої стерильності та Rht-D1c (ген карликовості). Tian and Liu (2001). Development of dominant nuclear male-sterile lines with a blue seed marker in durum and common wheat, *Plant Breeding* 120, 79-81. Потенційне застосування цієї додаткової лінії описано в Zong-Jun Pu et al. (2005). Studies on breeding of dominant nuclear dwarf male sterile lines with a blue seed marker in common wheat, Wheat Information Services Number 99: 46-50.

b- Застосування додаткової заміщеної лінії

Інший спосіб одержання гібридних зернових культур описаний у WO 92/01366. Лінію-відновник, гомогенну за 4В, яка містить рецесивну мутацію стерильності та додаткову транслоковану 4 хромосому, що містить маркер синього забарвлення та ген-відновник, самозапилюють з одержанням заміщеної лінії 2n, гетерологічної за 4В, що містить хромосому, яка несе рецесивну мутацію та не має маркера забарвлення, а також хромосому, що містить транслокацію.

Похідний протокол описаний King et al., (1991). Induction of a mutation in the male fertility gene of the preferentially transmitted *Aegilops sharonensis* chromosome 4S and its application for hybrid wheat production, *Euphytica* 54: 33-39.

У WO 93/13649 описана інша лінія-відновник фертильності, що походить із попередньої лінії в результаті кросинговеру між двома хромосомами 4S. Таку транслокацію слід одержувати із застосуванням мутантної пшениці зі зміненим спарюванням гомологічних хромосом, наприклад: (ph1 або ph2), Sutton T. (2003)., *The Plant Journal* 36, 443-456 Able J. (2006). *Trends in Plant Science*, Vol. 11 N°6, та Choon-Lin Tiang et al. (2012). *Plant Physiol*, Vol. 158, p 26-34.

Інші різні способи одержання гібридів пшениці описані у WO 03/057848.

Деякі стратегії на основі ГМО для одержання рослин з чоловічою стерильністю або жіночих рослин описані, наприклад, у WO 2005/005641 (див. також Whitford et al. et al., (2013) Hybrid breeding in wheat: technologies to improve hybrid wheat seed production, *Journal of Experimental Botany*, попередня електронна публікація опублікована 31 жовтня).

Даний винахід також можна реалізувати, застосовуючи чоловічу рослину, яка є більш життєздатною, для того, щоб гібрид міг одержувати краще запилення. Гібридна чоловіча рослина має бути повним відновником для стерильної жіночої рослини. Наприклад, якщо жіноча стерильність основана на гомозиготному рецесивному стані ms (як у 4E-ms), то чоловіча рослина має бути гомозиготою дикого типу.

Як пояснювалось раніше, чоловічі рослини можуть все ще бути наявні під час збирання врожаю, та зібраний насіннєвий фонд може все ще містити насіння чоловічих рослин, що самозапліднюються. Можна застосовувати фенотипічні маркери або обробку насіння для сприяння видаленню такого небажаного насіння після збору врожаю та для підвищення рівня гібридного насіння в комерційному продукті.

Наприклад, можна застосовувати обладнання для очищення насіння, просіювач насіння, сортувальник насіння, пневмостіл, аспіраційне обладнання, комірковий сортувальник, оптичний сортувальник насіння. Наприклад, можна застосовувати батьківські лінії з помітною різницею в TGW (масі тисячі зерен), та відбір можна проводити на сепараційному пристрої "Petkus" (US 8502019).

Іншим прикладом є застосування генів червоного/білого забарвлення зерна (Sherman J.D. et al. (2008): Microsatellite markers for kernel colour genes in wheat. *Crop Science*, 48: 1419-1424). Червоне забарвлення насіння пшениці контролюється домінуючими алелями одного або декількох із трьох генів, а саме R-A1b (на хромосомі 3AL), R-B1b (на 3BL) та R-D1b (на 3DL) (Sherman et al., 2008). Існує "ефект дози" цих алелів червоного забарвлення: що більше алелів червоного забарвлення несе насінина, то більш інтенсивним є червоне забарвлення. Біле забарвлення можна одержати за відсутності алелів червоного забарвлення в локусі 3 (r-a1b, r-b1b та r-d1b).

Червоне забарвлення експресується по материнській лінії із забарвленням диплоїдних тканин оплодня. Це означає, що, хоч яким би було схрещування, насіння F1 буде мати те саме

забарвлення, що й жіноча батьківська рослина. Залежно від забарвлення насінини та твердості зерна, що утворюється, зерна пшениці та одержуване в результаті їх помелу борошно можуть бути віднесені до різних ринкових класів: пшениця з червоними та білими зернами є переважною для деяких ринків.

Отже, можна відсортувати якщо не все, то більшу частину насіння чоловічих рослин від партії гібридного насіння за допомогою різниці в забарвленні насіння між насінням чоловічих рослин та гібридним насінням, наприклад:

- у випадку чоловічої лінії з білим насінням (гомозиготної  $r-a1b$ ,  $r-b1b$  та  $r-d1b$ ) та жіночої лінії з червоним насінням (гомозиготної  $R-A1b$ ,  $r-b1b$  та  $r-d1b$  /  $r-a1b$ ,  $R-B1b$  та  $r-d1b$  /  $r-a1b$ ,  $r-b1b$  та  $R-D1b$  /  $R-A1b$ ,  $R-B1b$  та  $r-d1b$  /  $R-A1b$ ,  $r-b1b$  та  $R-D1b$  /  $r-a1b$ ,  $R-B1b$  та  $R-D1b$  або  $R-A1b$ ,  $R-B1b$  та  $R-D1b$ ) гібридне насіння буде червоним, а насіння чоловічих рослин, одержане в результаті самозапилення, буде білим;

- у випадку чоловічої лінії з червоним насінням (гомозиготної  $R-A1b$ ,  $r-b1b$  та  $r-d1b$  /  $r-a1b$ ,  $R-B1b$  та  $r-d1b$  /  $R-A1b$ ,  $R-B1b$  та  $r-d1b$  /  $R-A1b$ ,  $r-b1b$  та  $R-D1b$  /  $r-a1b$ ,  $R-B1b$  та  $R-D1b$  або  $R-A1b$ ,  $R-B1b$  та  $R-D1b$ ) та жіночої лінії з білим насінням (гомозиготної  $r-a1b$ ,  $r-b1b$  та  $r-d1b$ ) гібридне насіння буде білим, а насіння чоловічих рослин, одержане в результаті самозапилення, буде червоним;

- у випадку чоловічої лінії зі світло-червоним насінням (гомозиготної  $R-A1b$ ,  $r-b1b$  та  $r-d1b$  /  $r-a1b$ ,  $R-B1b$  та  $r-d1b$  /  $r-a1b$ ,  $r-b1b$  та  $R-D1b$ ) та жіночої лінії з темно-червоним насінням (гомозиготної  $R-A1b$ ,  $R-B1b$  та  $R-D1b$ ) гібридне насіння буде темно-червоним, а насіння чоловічих рослин, одержане в результаті самозапилення, буде світло-червоним;

- у випадку чоловічої лінії з темно-червоним насінням (гомозиготної  $R-A1b$ ,  $R-B1b$  та  $R-D1b$ ) та жіночої лінії зі світло-червоним насінням (гомозиготної  $R-A1b$ ,  $r-b1b$  та  $r-d1b$  /  $r-a1b$ ,  $R-B1b$  та  $r-d1b$  /  $r-a1b$ ,  $r-b1b$  та  $R-D1b$ ) гібридне насіння буде світло-червоним, а насіння чоловічих рослин, одержане в результаті самозапилення, буде темно-червоним.

Насіння наступного покоління ( $F_2$ ) першого гібрида буде червоним у будь-якому випадку, оскільки гібридні рослини будуть гомозиготними за одним із трьох генів червоного забарвлення.

Сортування насіння можна виконувати за допомогою будь-якої традиційної оптичної сортувальної машини, здатної відокремлювати біле насіння від червоного насіння або світло-червоне насіння від темно-червоного насіння. Сортування насіння за цими типами забарвлення із застосуванням NIR описана у Wang et al., (1999). Single Wheat Kernel Colour Classification by Using Near-Infrared reflectance Spectra Cereal Chemistry, Vol. 76, No 1.

Насіння також можна відсортувати за його розміром на специфічному ситі (наприклад, 2,8 мм) для видалення найбільш дрібного або зморщеного насіння, яке, як правило, має менший розмір, ніж гібриди.

Даний винахід далі буде описано за допомогою необмежувальних прикладів.

Приклад 1. Пшениця

Для створення необхідної різниці у висоті застосовували доступні у пшениці гени карликовості. Застосовували подвійну карликову жіночу рослину  $Rht-B1b/Rht-B1b$ ,  $Rht-D1b/Rht-D1b$  (алелі з адитивними ефектами) спільно з чоловічою рослиною дикого типу  $Rht-B1a/Rht-B1a$ ,  $Rht-D1a/Rht-D1a$ . Чоловіча рослина дикого типу переважно не є чутливою до вилягання. Переважно вибирали гібрид  $Rht-B1b/Rht-B1a$ ,  $Rht-D1b/Rht-D1a$ , який мав проміжну висоту, близьку до такої у комерційній лінії (найчастіше  $Rht-B1b/Rht-B1b$ ,  $Rht-D1a/Rht-D1a$  або  $Rht-B1a/Rht-B1a$ ,  $Rht-D1b/Rht-D1b$ ).

Визначення зменшення насінневого фонду під час застосування гліфосату після періоду цвітіння

- Польовий тест для різних генотипів

Після періоду цвітіння рослини 5 елітних ліній європейської озимої пшениці обробляли шляхом ручного застосування щодо колосків щітки, просоченої розчином гліфосату за 120 г/л (що рекомендується для збирання бур'янів у Великобританії). За повного дозрівання збирали колоски оброблених та необроблених рослин з основного стебла, а також з пагонів, та їхню фертильність визначали та виражали у вигляді величини співвідношення насіння/вторинні колоски. Для кожної із 5 елітних ліній збирали 7-12 повторностей від необроблених рослин та 20-24 повторності від оброблених рослин.

Таблиця 1

## Результати польових тестів

		Насіння/вторинне колосся			% непророслого насіння	
		Середня величина	Стандартне відхилення	Повторності	Загальна кількість тестованого насіння	%
Alixan	необроблене	2,14	0,6	12	60	8,3 %
Alixan	оброблене	2,36	0,5	22	120	90,0 %
Allezy	необроблене	1,70	0,5	7	60	5,0 %
Allezy	оброблене	2,12	0,5	24	120	68,3 %
Altigo	необроблене	1,94	0,4	10	60	31,7 %
Altigo	оброблене	2,02	0,4	22	120	69,2 %
Buster	необроблене	2,09	0,9	10	60	16,7 %
Buster	оброблене	2,12	0,7	22	120	78,3 %
Charger	необроблене	1,79	0,9	8	60	13,3 %
Charger	оброблене	2,04	0,7	20	120	85,0 %
СЕРЕДНЄ	необроблене	1,93	0,66	9	60	15,0 %
СЕРЕДНЄ	оброблене	2,13	0,58	22	120	78,2 %

Як можна зрозуміти із наведеної вище таблиці, середнє число насіння у вторинних колосків (середня величина) у необроблених рослин становило 1,93 (стандартне відхилення 0,66), а фертильність колосків в оброблених рослин становила 2,13 (стандартне відхилення 0,58). Сукупності насіння необроблених та оброблених рослин статистично не відрізнялись. У такому експерименті з обробкою гербіцидом число насіння на зібрані колоски значно не знижувалось.

Проте насіння оброблених колосків було зморщеним порівняно з насінням необробленого колосся. Таке зморщене насіння мало менший розмір, та його було порівняно легко видалити під час обробки насіння після збирання врожаю. Розвиток нормальної рослини зі зморщеної насінини мало ймовірний. У середньому 78,2 % насіння з оброблених колосків (120 тестованого насіння на борозну) було нежиттєздатним (не проростало) порівняно з 15,0 % насіння із необроблених колосків (60 тестованого насіння на борозну).

- Тест строків застосування гербіциду в тепличних умовах

Експеримент проводили в теплиці шляхом застосування розчину гліфосату за 120 г/л щодо основного колосся рослин сорту Apache за допомогою просоченої щітки з протикрапельною системою на 4 наступних стадіях розвитку:

- основне колосся в період цвітіння (обробка 1),

- основне колосся після періоду цвітіння, вторинні пагони в період цвітіння ще відсутні (обробка 2),

- основне колосся після періоду цвітіння, вторинний(вторинні) пагін(пагони) в період цвітіння (обробка 3),

- основне колосся після періоду цвітіння, вторинний(вторинні) пагін(пагони) після періоду цвітіння (обробка 4).

Гліфосатом обробляли щонайменше 10 колосків за одну обробку. Основне колосся (що далі називають "колосся основного стебла"), а також колосся пагонів (що далі називають "колосся вторинних стебел") збирали та молотили для визначення сукупності насіння/колосся.

Таблиця 2

## Результати тесту в тепличних умовах

види обробки	колоски основного стебла				колоски вторинних стебел			
	число	сукупність насіння			число	сукупність насіння		
		середнє	стандартне відхилення	зморщене		середнє	стандартне відхилення	зморщене
без обробки	19	34,2	10,7	2,9 %	28	25,9	9,1	5,8 %
1	19	0			20	10,8	17,2	0 %
2	18	6,7	11,9	60,0 %	22	14,2	18,6	10,5 %
3	15	30,3	6,4	100,0 %	25	22,8	15,3	42,3 %
4	14	38,1	6,8	67,4 %	18	34,7	13,7	11,8 %

Як можна відзначити з наведеної вище таблиці 2, для необробленого колосся (контроль) середнє число насіння в сукупності/колосся в 19 колосках становило 34,2 на основних стеблах та 25,9 в 28 колосках на вторинних стеблах.

Що стосується колосків, оброблених згідно з обробкою 1, то насіння в колосках основних стебел не утворювалось, а сукупність насіння в колосках вторинних стебел значно зменшувалась порівняно з контрольною обробкою без обробки (в середньому 10,8 проти 25,9).

Що стосується колосків, оброблених згідно з обробкою 2, тобто оброблених одразу після періоду цвітіння, то колоски основних стебел давали в середньому лише 19,6 % від числа насіння в сукупності, утвореній необробленими колосками. Більшість такого насіння було зморщеним (60 %). Колоски на вторинних пагонах давали далеко не нормальні сукупності насіння (14,2).

Що стосується колосків, оброблених згідно з обробкою 3, то сукупності насіння оброблених основних колосків характеризувалися фертильністю, близькою до нормальної, проте в них було одержане лише зморщене насіння. Колоски на вторинних пагонах характеризувалися порівняно нормальною фертильністю, проте 42,3 % утвореного насіння було зморщеним.

Що стосується колосків, оброблених згідно з обробкою 4, то обробка гліфосатом, проведена після періоду цвітіння на рівні рослин, не порушувала плодовитість, проте на оброблених основних колосках більшість насіння було зморщеним (67,4 %). Велика сукупність насіння на необроблених пагонах могла бути зумовлена перерозподілом поживних речовин всередині рослини.

Висновок за даним експериментом полягав у тому, що кожний колосок, оброблений після періоду цвітіння, міг давати насіння, проте більшість (67,4 %) такого насіння було зморщеним та було б усунуто під час обробки насіння. Очевидно, дифузія гліфосату всередину рослини впливала на фертильність необробленого колосся на тій самій рослині, якщо тільки необроблені колоски не досягали періоду цвітіння. Оскільки обробку гліфосатом проводили тільки тоді, коли вся рослина завершувала цвітіння, кожний колосок, безпосередньо не охоплений обробкою, міг утворювати більшість життєздатного насіння, проте це насіння було більшою мірою зморщеним. Навіть при незабезпеченні повного усунення насіння чоловічих рослин обробка гліфосатом після періоду цвітіння значно зменшила насіннєвий фонд чоловічих рослин, сприяючи підвищенню співвідношення жіночих/чоловічих рослин у виробничій системі змішаного насадження.

Здатність давати життєздатні паростки тестували на підмножині насіння, що піддали обробкам "без обробки" та "обробка 4".

Той самий експеримент повторювали на елітній лінії Alіxan.

Польовий тест в імітаційній виробничій системі змішаного насадження

Проводили імітаційний тест одержання гібридів. Фертильна карликова лінія низькорослого комерційного сорту (Courtot, гомозиготний Rht-B1b-Rht-D1b) імітувала "жіночу рослину", а фертильна середньоросла лінія високорослого комерційного сорту дикого типу (Alhambra, гомозиготний Rht-B1a-Rht-D1a) імітувала "чоловічу рослину". Ці дві лінії характеризувались схожим раннім дозріванням, та їх змішували під час висівання в наступних співвідношеннях:

- 95 % Courtot змішували з 5 % Alhambra.
- 90 % Courtot змішували з 10 % Alhambra.
- 85 % Courtot змішували з 15 % Alhambra.
- 80 % Courtot змішували з 20 % Alhambra.

Були включені два контролі відповідно із 100 % Courtot та 100 % Alhambra.

Кожний прямокутник польового експерименту являє собою блок або ділянку розміром 1,5 м×6 м з описанням висіяних видів: Courtot (висіювання тільки насіння Courtot), Alhambra (висіювання тільки насіння Alhambra), Courtot-AL-95/5 (висіювання суміші 95 % Courtot та 5 % Alhambra), Courtot-AL-90/10 (висіювання суміші 90 % Courtot та 10 % Alhambra), Courtot-AL-85/15 (висіювання суміші 85 % Courtot та 15 % Alhambra), Courtot-AL-80/20 (висіювання суміші 80 % Courtot та 20 % Alhambra).

Позначення: розташування на полі наведено за перетином номерів ділянок зліва та номерів внизу.

10 - Ділянки, розташовані на 13-18/2, 13-18/5, 7-12/3 та 1-6/4: без обробки  
 - Ділянки, розташовані на 13-18/3, 7-12/4, 1-6/2 та 1-6/5: 1 обробка  
 - Ділянки, розташовані на 13-18/4, 7-12/2, 7-12/5 (ділянки не враховували в результатах) та 1-6/3: 2 обробки

15 Під час збирання врожаю сукупність насіння жіночої рослини розглядали як змодельоване гібридне насіння. Відповідно, експеримент мав невелику погрішність, оскільки така змодельована сукупність гібридного насіння була достатньо оптимальною. Гліфосат за 120 г/л застосовували після періоду цвітіння щодо "чоловічих" рослин за допомогою просоченої губки шляхом застосування в одному напрямку (1 обробка) або застосування в двох (протилежних) напрямках (2 обробки). Для кожної умови проводили чотири повторності згідно з польовим експериментом.

20 Результати наведені в таблиці 3. На ділянках тільки з Alhambra спостерігали вилягання від помірного до сильного, що пояснювало врожайність. На противагу на ділянках з Courtot-Alhambra вилягання Alhambra не спостерігали: Courtot виступав як опора. Чутливість до вилягання чоловічих рослин у підсумку можна було значно знизити у виробничій системі змішаного насадження. Обробка колосків Alhambra, результатом якої було зменшення сукупностей насіння в них, обмежувала врожайність на змішаних ділянках на величину до 51,8 % (суміш Courtot-AL-80/20, 2 обробки). Такий результат вказував на те, що процентну частку чоловічих рослин під час одержання гібридів доводилось скорочувати для обмеження впливу на врожайність жіночих рослин.

30

Таблиця 3

	Урожайність у тоннах				
	0 обробок	1 обробка		2 обробки	
	тонна/га	тонна/га	% зниження	тонна/га	% зниження
Alhambra	3,63	5,98		5,60	
Courtot	5,88	5,26		5,66	
Courtot-AL-80/20	5,53	3,44	37,7 %	2,67	51,8 %
Courtot-AL-85/15	5,19	3,17	38,8 %	3,17	38,8 %
Courtot-AL-90/10	5,76	3,95	31,4 %	3,67	36,3 %
Courtot-AL-95/5	5,37	4,41	17,8 %	4,28	20,1 %

Таблиця 3: результати врожайності для ділянок, засіяних тільки Courtot або Alhambra або сумішшю насіння Courtot та Alhambra. Результати в тоннах/га. % зниження являє собою зниження урожайності для комбінації висіяних Courtot та Alhambra × однією або двома обробками порівняно з тією самою умовою без обробки.

35 Застосовували молекулярні маркери генів Rht-B1b та Rht-D1b для ідентифікації насіння Courtot (що представляли гібридне насіння в даній моделі) та насіння Alhambra, що представляли насіння чоловічих рослин у даній моделі. Аналізували 24 насінини з кожної окремої ділянки, і результати наведені в таблиці 4.

40 Завдяки конкурентній перевазі високорослих чоловічих рослин відносно низькорослих жіночих рослин кількість насіння чоловічих рослин порівняно з кількістю насіння жіночих рослин приблизно подвоювалась під час збирання врожаю порівняно з кількістю під час висівання в умовах без обробки. Наприклад, у суміші "Courtot-Alhambra-90 %/10 %" Alhambra давала 10 % насіння під час висівання, проте його частка зростала до 19,7 % під час збирання врожаю. Без часткового пошкодження або усунення чоловічих рослин виробництво в змішаному насадженні із застосуванням високорослих чоловічих рослин було б нездійсненним. Подвійне/двонаправлене застосування, вочевидь, було ефективнішим, ніж однократне застосування. Наприклад, у суміші "Courtot-Alhambra-90 %/10 %" та під час обробки в двох

45

напрямках частка насіння Alhambra під час збору врожаю знижувалась до 2,2 %, що приводило до гібридності 97,8 %. Під час подвійного/двонаправленого застосування "гібридність" зібраних партій завжди перевищувала 90 %.

Таблиця 4

	Обробка	% ALHAMBRA		Змодельована гібридність
		Висівання	Збирання врожаю	%
Courtot-Alhambra-80 %/20 %	0	20	35,8	64,2
	1	20	24,1	75,9
	2	20	5,1	94,9
Courtot-Alhambra-85 %/15 %	0	15	37,5	62,5
	1	15	10,1	89,9
	2	15	2,4	97,6
Courtot-Alhambra-90 %/10 %	0	10	19,7	80,3
	1	10	10,8	89,2
	2	10	2,2	97,8
Courtot-Alhambra-95 %/5 %	0	5	11,6	88,4
	1	5	3,4	96,6
	2	5	0,0	100
Alhambra	0	100	100,0	
	1	100	98,9	
	2	100	96,7	
Courtot	0	0	0,0	100
	1	0	0,0	100
	2	0	0,0	100

5

Таблиця 4: для кожної суміші насіння та кожної обробки відсоткова частка насіння "чоловічих рослин" (Alhambra) вказана під час висівання та під час збирання врожаю. Змодельовану гібридність розраховували у вигляді відсоткової частки "насіння жіночих рослин" (Courtot) в зібраній партії. 0 обробок відповідало ділянкам без обробки, 1 обробка - ділянкам з обробкою гліфосатом з одним застосуванням та 2 обробки - обробкою гліфосатом із застосуванням у двох напрямках. "Висівання" відповідало відсотковій частці насіння Alhambra під час змішаного висівання, а "врожай" - відсотковій частці насіння Alhambra в зібраному насінні.

Приклад 2. Ячмінь

Попередні тести застосування гербіцидів проводили влітку 2013 р., коли щодо високорослих рослин ячменю на ділянках більш низькорослого ячменю за допомогою машини для збирання бур'янів застосовували гліфосат у нормі, рекомендованій постачальником. Спостерігали, що високорослий ячмінь можна було знищити без пошкодження напівкарликових рослин ячменю, що знаходились на тих самих ділянках.

Такий самий експеримент проводили за допомогою ріжучого інструмента щодо суміші високорослих та більш низькорослих рослин, та високорослі рослини можна було вибірково зрізати.

Також проводили одержання гібридів з двома лініями ячменю, генотипи яких позначали як А та В. Зібрану сукупність насіння просіювали за допомогою пристрою для калібрування насіння. Одержували три різні класи насіння з крупними розмірами насіння: більше від 2,8 мм, середні, тобто більше від 2,5 мм, та дрібні, тобто менше від 2,5 мм. Молекулярний аналіз цих партій насіння показав, що гібридне насіння знаходилось переважно в першій партії з більшим розміром насіння. Частка гібридного насіння, яке не було відкалібровано, становила 72 %, тоді як частка гібридного насіння в підвибірці з розміром більше від 2,8 мм становила 96 %.

Даний експеримент показав, що застосування сортувального пристрою для насіння може підвищувати частку гібридного насіння в зібраних партіях насіння.



ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб обмеження частки насіння чоловічих рослин зернових культур, що самозапліднюються, в насінневому фонді, який отримується з поля, що включає насадження  
5 більш низькорослих жіночих запилених рослин з чоловічою стерильністю і насадження більш високорослих рослин з чоловічою фертильністю, де більш низькорослі жіночі запилені рослини з чоловічою стерильністю є карликовими, напівкарликовими або подвійними карликовими рослинами, де спосіб включає пропускання інструмента, який проходить вище від висоти більш  
10 низькорослих жіночих рослин, між періодом цвітіння та збиранням урожаю, при цьому за допомогою інструмента наносять гербіцид на рослини з чоловічою фертильністю, які перевищують висоту більш низькорослих жіночих рослин, при цьому відбувається запобігання або послаблення нормального розвитку рослин з чоловічою фертильністю, що перевищують цю висоту і розділення насіння за розміром або щільністю для видалення небажаного зморщеного насіння чоловічих рослин, що самозапилюються, після збору врожаю.
- 15 2. Спосіб за п. 1, де жіночі рослини з чоловічою стерильністю та рослини із чоловічою фертильністю знаходяться в загальних або окремих рядах.
3. Спосіб за п. 1 або п. 2, де вказаний інструмент являє собою машину для видалення бур'янів.
4. Спосіб за п. 3, де застосовуваний гербіцид є системним.
5. Спосіб за будь-яким з пунктів 1-4, де після збирання врожаю додатково здійснюється відбір  
20 насіння для видалення небажаного насіння чоловічих рослин, що самозапліднюються, із застосуванням фенотипічної ознаки.
6. Спосіб за п. 5, де фенотипічний маркер асоційований із сукупністю жіночих рослин з чоловічою стерильністю та/або рослин із чоловічою фертильністю, і такий маркер застосовують для додаткового відокремлення насіння, одержуваного з чоловічих рослин, що  
25 самозапліднюються, від гібридного насіння.
7. Спосіб за п. 6, де фенотипічним маркером є забарвлення.
8. Спосіб за будь-яким з пунктів 1-7, де зернова культура являє собою овес, пшеницю, ячмінь, рис, спельту, тритикале, просо або жито.
9. Спосіб за будь-яким з пунктів 1-8, де пристрій містить горизонтальну смугу, яка є рухливою і  
30 приводиться в рух двигуном або закріплена на засобі пересування, приведеному в рух двигуном.
10. Спосіб за п. 9, де висота, на якій розташована смуга, є регульованою.
11. Спосіб за п. 10, де висота, на якій розташована смуга, може змінюватися при її проходженні по сільськогосподарській культурі.
- 35 12. Спосіб за будь-яким з пунктів 1-11, де застосування гербіциду призводить до появи передчасно усохлого або зморщеного насіння чоловічих рослин, де вказане насіння може бути видалене в ході розділення насіння за щільністю.
13. Спосіб за будь-яким з пунктів 1-12, де вказаний гербіцид застосовують між періодом цвітіння і 30, 20 або 10 днями після періоду цвітіння.
- 40 14. Спосіб за п. 4, де гербіцид включає гліфосат.

---

Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

---

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,  
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

---

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601